

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.16

П. С. Кириллов, Л. П. Трофимук

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО РЕГУЛЯТОРА РОСТА
ДЛЯ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *CRATAEGUS**

В работе представлены результаты использования нового регулятора роста для микро-размножения некоторых видов рода *Crataegus*. Были разработаны приемы микроклонального размножения *C. arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*, основанные на регенерации растений из апикальных и латеральных почек побега. Гормональный состав питательной среды влияет не только на развитие побега, но и на его морфометрические показатели. При культивировании почек с применением нового биостимулятора было достигнуто увеличение количества побегов и междоузлий, что привело к повышению коэффициента размножения в 1,5–1,6 раза по сравнению с традиционно применяемыми стимуляторами. Зарегистрировано увеличение длины корней. Отмечено образование плотного, имеющего морфогенную структуру каллуса, что может служить хорошей предпосылкой для дальнейшего соматического эмбриогенеза. Библиогр. 17 назв. Ил. 3. Табл. 4.

Ключевые слова: регулятор роста, культура тканей, *in vitro*, *Crataegus*.

P. S. Kirillov¹, L. P. Trofimuk²APPLICATION OF A NEW GROWTH REGULATOR FOR MICROPROPAGATION OF SOME SPECIES OF THE GENUS *CRATAEGUS*

¹ S. M. Kirov Saint Petersburg State Forest Technical University, 5, Institutsky per., St. Petersburg, 194021, Russian Federation; spbftu@gmail.com

² JSC "All-Russian research Institute of paper", 49, 2nd Murinsky pr., St. Petersburg, 194021, Russian Federation; radoste@ya.ru

The paper presents the results of application of a new growth regulator for micropropagation of some species of the genus *Crataegus*. In the study we developed methods for microclonal propagation of *Crataegus arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*, based on regeneration of plants from apical and lateral buds of the shoot. The hormonal composition of the nutrient medium not only affects the development of the sprout, but also on its morphometric parameters. At cultivation of buds with application of a new biostimulator an increase in number of escapes and interstices has been reached that has led to increase of coefficient of reproduction by 1,5–1,6 times in comparison with traditionally applied stimulators. Also when using a new biostimulator an increase in length of roots was

П. С. Кириллов (spbftu@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С. М. Кирова, Российская Федерация, 194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., 5; Л. П. Трофимук (radoste@ya.ru): ОАО «Всероссийский НИИ бумаги», Российская Федерация, 194021, Санкт-Петербург, 2-й Муринский пр., 49.

* Работа выполнена при поддержке Департамента по науке и инновациям Ямало-Ненецкого автономного округа по госконтракту от 25 июля 2012 года № 01-15/4.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

recorded. During the research it was observed the formation of dense structure having morphogenic callus, which can serve as a good precondition for further somatic embryogenesis. Refs 17. Figs 3. Tables 4.

Keywords: growth regulator, tissue culture, *in vitro*, *Crataegus*.

Введение

Общеизвестно, что видовое разнообразие декоративных древесных и кустарниковых пород существенно повышает эстетический облик городов. Из-за невысокой декоративности деревьев и кустарников, используемых при озеленении Санкт-Петербурга, а также из-за ограниченного использования новых видов облик мегаполиса, создаваемый его зелеными насаждениями, нельзя назвать богатым и многообразным. Для формирования разнообразия и привлекательности зеленых насаждений необходим относительно богатый ассортимент перспективных видов, форм и сортов. Импортный посадочный материал имеет высокую цену и зачастую не адаптирован к условиям Северо-Запада России. Сегодня город остро нуждается в большом количестве посадочного материала высшего качества, адаптированного к условиям Санкт-Петербурга. Для озеленения города логично было бы использовать посадочный материал местных ботанических садов, так как со времени их основания накоплен большой генофонд древесных и кустарниковых растений, успешно адаптированных к условиям региона. Для увеличения ассортимента посадочного материала могут быть высажены представители рода *Crataegus* L.

Род *Crataegus* насчитывает около 1200 видов, произрастающих в умеренных, реже субтропических областях Северного полушария [1]. В России встречается около 15 дикорастущих видов боярышников. Боярышники не только долговечны и декоративны, но и устойчивы как к механическим повреждениям, так и промышленному загрязнению. К почве не требовательны, но лучше развиваются на хорошо дренированных почвах. В культуре не прихотливы, из-за быстрого роста и побегообразования нуждаются в периодической обрезке. Почти все боярышники — не только хорошие медоносы, но и ценные лекарственные, пищевые растения. Как и их ближайшие родственники — яблоня и рябина, боярышники широко используются в качестве плодовой культуры.

Листья, цветы, плоды боярышников активно используются в медицине. В плодах и листьях боярышников содержатся дубильные вещества, жирные масла, пектины, витамины, флавоноиды: гиперозид, кверцитрин, кверцетин, витексин, ацетилвитексин, а также кофейная и хлорогеновая кислоты [2]. Немаловажное значение имеет наличие в растениях эпикатехина, применяемого для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Вегетативное размножение зелеными черенками для боярышников малоэффективно [3]. Семенное размножение также малоэффективно по ряду факторов: нерегулярное плодоношение, количество партенокарпических семян может превышать 50 %, длительный период прорастания семян (250–400 дней) [4], поэтому широкое использование боярышников в озеленении ограничено малым количеством адаптированного посадочного материала, полученного традиционными способами.

Применение методов культуры ткани позволит добиться повышения коэффициента размножения экспланта. Работ по микрклональному размножению взрос-

лых экземпляров боярышников очень мало. Разработаны успешные способы введения в культуру *in vitro* *C. aroniana* L., *C. pojarkovae* Kossykh, *C. pinnatifida* Bunge. В работах [5–7] указывается оптимальная среда для культивирования: питательная среда по прописи Мурашиге, Скуча (Murashige Skoog, MS) [8] (pH 5,6–5,8) и ее модификации с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) и индолил-3-масляной кислоты (ИМК).

В связи с тем, что исследований по внедрению новых стимуляторов ризогенеза у боярышников выявлено не было, перед нами стояла задача испытать биостимулирующую систему S-8A (D,L-глутаминовая кислота + D,L-аспарагиновая кислота + L-α-аланин + L-треонин + L-аминомасляная кислота + 3-аминомасляная кислота + D,L-лейцин + D,L-тирозин + D,L-триптофан + 4-аминобензойная кислота + глицин + D-глюкоза). Данная система разработана с использованием триптофана — основного источника образования природного ауксина (индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)) и впервые испытана в Санкт-Петербургском государственном лесотехническом университете (СПбГЛТУ). Триптофан стимулирует формирование вторичных корней у молодых растений, а также корневых волосков. Аминокислоты являются одними из самых активных участников метаболизма с первых дней жизни растения. Они увеличивают суммарное содержание хлорофиллов в растении, что может приводить к повышению фотосинтеза. Регуляторы роста ауксинового ряда и фенилпропионовой кислоты образуются при деаминации триптофана, а β-аланин — путем декарбоксилирования аспарагиновой кислоты. Для роста растений на первых этапах жизни важное значение имеют процессы декарбоксилирования аминокислот. Образующиеся при этом промежуточные соединения в дальнейшем участвуют в синтезе аминокислот и стимуляторов роста и развития. Аминокислоты и продукты их окислительно-восстановительных превращений (в большей степени на начальных этапах роста и развития растения) не только играют роль питательных веществ в растении, но и являются физиологически активными веществами, регулирующими жизнедеятельность клеток и рост растительных тканей. В настоящее время данная система проходит стадию оформления патента, в связи с этим более детальное описание препарата невозможно.

Данная система является усовершенствованной версией стимулирующей системы S-5, которая хорошо зарекомендовала себя при вегетативном размножении трудно укореняемых видов хвойных и лиственных пород. Использование S-5 по сравнению с традиционно применяемыми ауксинами (ИМК, ИУК) показало увеличение коэффициента размножения у пихт практически в 3 раза [9]. При микроклональном размножении *Betula pendula* Roth var. *dalecarlica* Schneid (используя листовые диски с фрагментами черешков в качестве исходного материала) с помощью биостимулирующей системы S-8A и зеатина отмечалось увеличение коэффициента размножения в 1,8 раза по сравнению со стандартно применяемыми ИУК и 6-БАП [10]. Как показали наши исследования, применение ИМК, ИУК, ИУК при размножении трудноукореняемых видов не целесообразно. Исследования по применению совместно S-8A и других ауксинов пока не проводились.

Из-за высокой стоимости использование зарубежных фитогормонов в России ограничено, а их синтетические аналоги не показывают желаемого морфогенетического эффекта. В связи с этим изучение новых стимуляторов роста, обладающих высокими морфогенетическими эффектами, все больше привлекает внимание

физиологов, биохимиков, растениеводов, занимающихся культивированием растительных тканей.

При изучении новых стимуляторов роста нами были отобраны некоторые представители рода Боярышник: *Crataegus arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*. Данные виды не только устойчивы в условиях агрессивной техногенной среды, но и декоративны в период вегетации, также их можно использовать при озеленении приусадебных участков и использовать в качестве интродуцентов в южных районах Ямало-Ненецкого автономного округа. Кроме того, данные виды успешно культивируются в условиях ботанического сада СПбГЛТУ.

Внедрение более эффективных стимуляторов роста может решить проблему по насыщению рынка необходимым количеством посадочного материала высшего качества. Научные работы по введению в культуру ткани сразу нескольких видов боярышников (различимых по своим свойствам и естественному ареалу обитания) ранее не проводились.

Целью данного исследования явилось изучение новой биостимулирующей системы ризогенеза и введение в культуру *in vitro* *Crataegus arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*.

Результаты данной работы могут быть полезны в области внедрения методик клонального размножения разных видов и форм боярышников, обладающих декоративными, фармацевтическими, пищевыми и другими ценностями.

Материал и методика

Материалом для проведения исследования являлись вегетативные почки *Crataegus arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*.

Боярышник Арнольда *Crataegus arnoldiana* Sarg. произрастает на северо-востоке США, устойчив к условиям Сибири. Отличается от сибирских видов кроной (может достигать 5,5–6 м в высоту) и крупными (до 3–4 см) сочными плодами. Содержание витамина С и каротина в плодах *C. arnoldiana* два раза больше, чем у сибирских видов [11]. Данный вид встречается крайне редко, главным образом в ботанических садах [12].

Боярышник даурский *C. dahurica* Koehne ex C. K. Schneid. распространен в южных районах Восточной Сибири, на Дальнем Востоке России, в Монголии и северных районах Китая. Это высокий кустарник, достигающий высоты 6 м. Данный вид имеет мелкую и изящную листву, а начало вегетации наступает раньше, чем у большинства других видов. В культуре встречается довольно редко, главным образом в ботанических садах [12].

Ареал боярышника кроваво-красного *C. sanguinea* Pall. с запада на восток превышает 5000 км. В России естественное местообитание — восток Европейской части, Западная Сибирь, Восточная Сибирь, Забайкалье; а также Казахстан, Средняя Азия, Китай и Монголия. Высокий кустарник — 1–5 м. Этот боярышник декоративен весной во время цветения и осенью. Его часто используют при создании живых изгородей. Химический состав заготавливаемого сырья (цветы, плоды и листья) очень сложный и поэтому полностью не изучен. Известно, что в цветках содержится до 32 мг/г калия, 77 мкг/г бора. Данный вид используют не только в медицине, но и в других областях. Древесина идет на изготовление столярных инструментов.

Кору можно использовать при дублении кожи и при окрашивании тканей в красный цвет. Плоды используют для приготовления варенья, суррогата чая. Кроме того, данное растение — хороший медонос.

Боярышник мягковатый *C. submollis* Sarg. — дерево высотой 6–8 м. Распространен в северо-восточных районах Северной Америки. Зимостойкий вид. Хороший медонос. Его часто высаживают на приусадебных участках как плодое дерево или как живую изгородь. Из плодов можно делать варенья и джемы.

Отбор растительного материала осуществляли с октября по апрель в дендрологическом саду СПбГЛТУ. В качестве первичных эксплантов использовали апикальные и латеральные почки с однолетних побегов растений, возраст которых насчитывает более 20 лет.

Для получения асептических эксплантов перед помещением на питательные среды был использован последовательный режим стерилизации: 5-минутная промывка эксплантов с дезинфицирующим мылом, 30-минутная выдержка в 0,5 %-м растворе фундазола, 3-минутная обработка 80 %-м раствором этанола и 3 %-м раствором перекиси водорода [6]. Стерилизацию растительного материала проводили в условиях ламинар-бокса с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные и промытые объекты помещали в чашки Петри на фильтры. Подготовленный таким образом материал использовали для вычленения меристем. Перед посадкой были удалены все почечные чешуи и часть листовых примордиев. В качестве питательной среды использовали среду по прописи MS (pH 5,6–5,8) с добавлением сахарозы, витаминов и органических веществ. Набор реагентов для приготовления 5 л среды MS (был закуплен в ООО «БиологТ»): 20-кратный раствор макроэлементов (кат. № 1.3.003), 1000-кратный раствор микроэлементов (кат. № 1.3.004), 1000-кратный раствор витаминов (кат. № 1.3.005), 100-кратный раствор хелата железа (кат. № 1.3.006), сахароза (кат. № 1.3.007), агар-агар (кат. № 1.3.009). В 1000-кратном растворе витаминов содержатся B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP и глицин. Для уменьшения вредного влияния продуктов окисления фенолов на этапе введения в культуру *in vitro* в среду MS (среда для инокуляции) добавлена аскорбиновая кислота (1000-кратный раствор) концентрацией 0,7 мг/л. Эксперимент проводили в трехкратной повторности по 50 эксплантов в каждом варианте. При оценке результативности микроклонирования учитывали: длину побега, количество побегов, число междоузлий, длину корней, образование раневого каллуса. В качестве интегрального показателя эффективности пролиферации рассчитывали коэффициент размножения (получение максимального количества растений регенерантов (в минимальные сроки), пригодных для повторного черенкования или пересадки в субстрат). Коэффициент размножения зависит от количества междоузлий (короткие междоузлия непригодны для черенкования), а также от наличия хорошо сформированной корневой системы [13]. На этапе ризогенеза фиксировали число укоренившихся микропобегов и по этим данным рассчитывали частоту укоренения в процентах.

Статистическую обработку данных проводили методами дисперсионного анализа (one-way ANOVA, two-way ANOVA) с использованием статистической программы SPSS Statistics 19.0, отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

В эксперименте в зависимости от этапа микроклонального размножения в качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли ауксины:

ИМК 0,1–0,5 мг/л; S-8A 0,3–0,5 мг/л и цитокинин: 6-БАП 0,2–0,5 мг/л. Выбранная концентрация ауксинов и цитокининов основана на ранее опубликованных материалах исследований ряда авторов [5–7, 12–17]. Полный состав питательных сред на различных этапах микроклонального размножения приведен в табл. 1.

Таблица 1. Состав питательных сред по MS для инокуляции, регенерации меристем и ризогенеза растений-регенерантов представителей рода *Crataegus in vitro*

Компоненты питательной среды	Состав питательных сред, мг/л				
	для инокуляции	для регенерации меристем	для ризогенеза		
Макроэлементы					
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1100	1100
KNO ₃	1900	1900	1900	1266,7	1266,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	293	293
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	246,7	246,7
KH ₂ PO ₄	170	170	170	113	113
Микроэлементы					
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
H ₃ BO ₃	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Витамины					
мезоинозит	100	100	100	100	100
тиамин-HCl (B ₁)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
пиридоксин-HCl (B ₆)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
цианкобаламин (B ₁₂)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
никотиновая кислота (PP)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
аскорбиновая кислота (C)	0,7	–	–	–	–
Фитогормоны					
6-БАП	0,3	0,5	0,5	0,2	0,2
ИМК	0,1	0,5	–	0,5	–
S-8A	–	–	0,5	–	0,3
Аминокислоты					
глицин	2	2	–	2	–
Другие вещества					
сахароза	30000	30000	–	20000	–
агар-агар	10000	10000	10000	10000	10000

Культуральные сосуды с эксплантатами содержали в фитолюминистате, где поддерживалась температура 24–26 °С, относительная влажность воздуха 60–80 % и 16-часовой фотопериод с освещенностью 3–4 клк. Субкультивирование осуществляли через 2 месяца.

Контролем являлась питательная среда MS без добавления регуляторов роста. Для укоренения побегов (этап ризогенеза) в зависимости от варианта использовали 6-БАП 0,2 мг/л, ИМК 0,5 мг/л и биостимулирующую систему S-8A 0,3 мг/л, внесенные в среду MS с уменьшенным в 1,5 раза содержанием макросолей.

Результаты и обсуждение

Используемый режим поверхностной стерилизации при введении в культуру *in vitro* оказался эффективным, обеспечив 85–95 % жизнеспособных стерильных эксплантов. Наибольшим потенциалом обладали экспланты, введенные в культуру в феврале—марте.

Важнейшую роль в процессе органогенеза играет гормональный состав питательной среды. При введении в культуру использовали низкую концентрацию цитокинина — 0,3 мг/л [7]. Активизация развития микропобегов у 80 % эксплантов наступала на восьмые сутки.

На питательной среде MS частота образования каллуса достигала 75 %. Менее чем у 5 % растений-регенерантов отмечалось развитие посредством прямого органогенеза, минуя стадию каллусообразования. Как отмечают некоторые исследователи [7, 15], образовавшийся плотный морфогенный каллус может служить объектом соматического эмбриогенеза.

Росторегулирующую активность исследуемой биостимулирующей системы S-8A оценивали по следующим морфометрическим показателям: длина побега, длина корней, число растений, выросших из одной меристемы с учетом качества междоузлий (коэффициент размножения), также учитывалась частота регенерации.

На питательной среде MS наблюдали активные процессы морфогенеза в зависимости от состава питательной среды. В табл. 2 приведены результаты начала развития апикальных и латеральных почек в условиях *in vitro* отобранных в феврале (среднее значение \pm стандартное отклонение).

При использовании среды MS без добавления регуляторов роста частота регенерации не превышала 5 %, из-за плотного каллуса корни не образовывались, наблюдалось образование укороченных междоузлий. На питательной среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИМК также образовывались укороченные междоузлия, вследствие чего снизился коэффициент размножения. В зависимости от гормонального состава питательной среды частота регенерации находится в пределах 61–78 %.

Выбранная концентрация цитокинина и S-8A оказала влияние на регенерацию адвентивных побегов и на индукцию пазушного побегообразования. Оба эти процесса, как известно, оказывают влияние на коэффициент размножения (рис. 1).

Наиболее высокие показатели коэффициента размножения обнаружены у *Crataegus dahurica* и *C. arnoldiana* на среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л S-8A — 3,91 и 3,89 соответственно. Коэффициент размножения при использовании S-8A у всех видов боярышников увеличился в 11,2–13,0 раза.

Таблица 2. Влияние состава питательной среды на морфометрические показатели и частоту регенерации культур боярышника

Морфометрические показатели	<i>Crataegus dahurica</i>	<i>Crataegus sanguinea</i>	<i>Crataegus submollis</i>	<i>Crataegus arnoldiana</i>
Вариант 1				
Длина побега, мм	11,2 ± 3,9	11,1 ± 3,4	10,5 ± 3,6	10,9 ± 4,4
Длина корней, мм	0	0	0	0
Количество побегов на 1 эксплант, шт.	1,4 ± 0,8	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,7
Частота регенерации, %	4	5	4	5
Вариант 2				
Длина побега, мм	40,0 ± 3,1	43,5 ± 3,2	47,0 ± 2,0	48,3 ± 2,8
Длина корней, мм	22,0 ± 2,2	21,7 ± 2,9	25,1 ± 2,9	23,2 ± 3,6
Количество побегов на 1 эксплант, шт.	3,4 ± 0,7	3,7 ± 0,9	3,8 ± 0,8	3,8 ± 0,7
Частота регенерации, %	63	62	71	61
Вариант 3				
Длина побега, мм	44,0 ± 4,4	45,5 ± 3,9	55,5 ± 3,8	53,3 ± 4,8
Длина корней, мм	33,9 ± 2,6	35,5 ± 1,9	39,2 ± 2,9	36,7 ± 3,6
Количество побегов на 1 эксплант, шт.	7 ± 1,0	5,9 ± 0,7	5 ± 0,9	5,4 ± 0,8
Частота регенерации, %	70	69	78	73

Примечание. Вариант 1 — контроль (среда MS без добавления регуляторов роста); вариант 2 — среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИМК; вариант 3 — среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л S-8A.

Применение ИМК стимулировало развитие 1–4 пригодных для дальнейшего размножения побегов, тогда как использование S-8A индуцировало развитие 3–5 побегов.

Результаты анализа изменчивости морфометрических показателей у регенерантов *Crataegus dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*, *C. arnoldiana* приведены в табл. 3, где отражены суммарные данные по всем проанализированным боярышникам, так как различия между показателями для каждого вида не превышают предел погрешности.

Изучено влияние генотипических особенностей и гормонального состава питательной среды на развитие регенерантов. По нашим наблюдениям, гормональный состав питательной среды влияет на развитие побегов и корней и их морфометрические показатели, что согласуется с данными других исследователей (сила влияния гормонального состава питательной среды составляла в среднем 25–48 %) [13–17]. По полученным данным можно предположить, что у изученных видов боярышников генотип определяет количество формирующихся растений *in vitro*, при этом не оказывая влияния на длину побегов и корней. Анализ изменчивости морфометрических показателей выявил, что во всех случаях наблюдается достоверное увеличение данных показателей в вариантах опыта по сравнению с контролем.

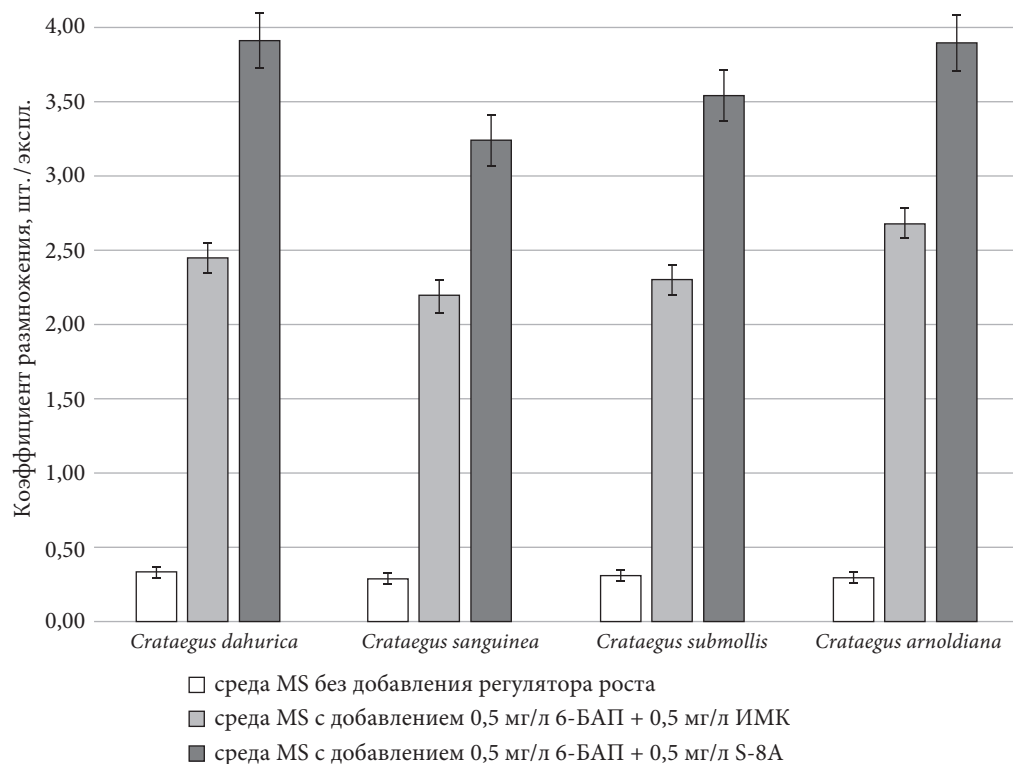


Рис. 1. Влияние стимуляторов роста на коэффициент размножения некоторых видов рода *Crataegus* в культуре *in vitro*

Таблица 3. Влияние состава питательной среды и генотипа на морфометрические показатели регенерантов боярышников

Морфометрические показатели	Источник изменчивости	Fфакт	Fтеор
Длина побега, мм	Среда	49,65	2,65
	Генотип	1,18	1,48
Длина корней, мм	Среда	33,47	2,65
	Генотип	0,73	1,48
Количество побегов на экспланте, шт.	Среда	12,66	2,65
	Генотип	1,57	1,48

Стимулирующее влияние 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л S-8A (вариант 3) на все морфометрические показатели изучаемых видов *Crataegus* относительно велико (в пределах 45–58 %) и значимо (с вероятностью $p > 0,95$). В то же время стимулирующее влияние 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИМК (вариант 2) на эти же показатели находится в пределах 5–53 % (с вероятностью $P > 0,95$). Применение 6-БАП + S-8A оказывает наибольший эффект на увеличение количества побегов и длину корней. Скорее всего, это связано с тем, что разработанный биостимулятор содержит в своем

составе комплекс веществ, который положительно влияет на все аспекты жизнедеятельности экспланта на этапах инокуляции и регенерации меристем. На основании полученных данных можно предположить, что влияние, оказываемое ИМК и S-8A на среднюю длину побега примерно одинаково. Фрагменты побегов с пазушными почками были использованы в последующих экспериментах для изучения влияния биостимулирующей системы S-8A на процесс ризогенеза.

Важным этапом микроразмножения является укоренение фрагментов побегов с пазушными почками. Решающее значение при укоренении оказывает выбор ауксина в оптимальной концентрации. На этапе укоренения было отобрано по 100 черенков на каждый вариант среды. Стопроцентная укореняемость означает, что корни образовались у 100 черенков. Контролем служила среда MS без добавления стимуляторов. Для укоренения использовали среду MS с уменьшенным в 1,5 раза содержанием макросолей и добавлением 6-БАП 0,2 мг/л + ИМК 0,5 мг/л (вариант 2), а также среда MS (без глицина и глюкозы) с добавлением 6-БАП 0,2 мг/л + S-8A 0,3 мг/л (вариант 3). К концу пассажа у определенного количества эксплантов в зависимости от выбранного ауксина развивались корни. Эффективность влияния стимуляторов ризогенеза представлена на рис. 2 и 3. Поскольку на среде без стимуляторов корни не образовывались, контроль на рисунках не представлен.

При использовании ИМК не отмечалось разветвления корневой системы. Как и на предыдущем этапе, происходило образование укороченных междоузлий.

Результаты анализа длины корней у регенерантов *Crataegus dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*, *C. arnoldiana* приведены в табл. 4.

Стимулирующее влияние 6-БАП 0,2 мг/л + S-8A 0,3 мг/л (вариант 3) на длину корней изучаемых видов рода *Crataegus* относительно велико (42 %) и значимо (с вероятностью $p > 0,95$). В то же время стимулирующее влияние 6-БАП 0,2 мг/л + ИМК 0,5 мг/л (вариант 2) на этот же показатель составило 31 % (с вероятностью $p > 0,95$).

Использование S-8A в сочетании с 6-БАП показало увеличение ризогенеза у культивируемых растений почти в два раза по сравнению с 6-БАП + ИМК.

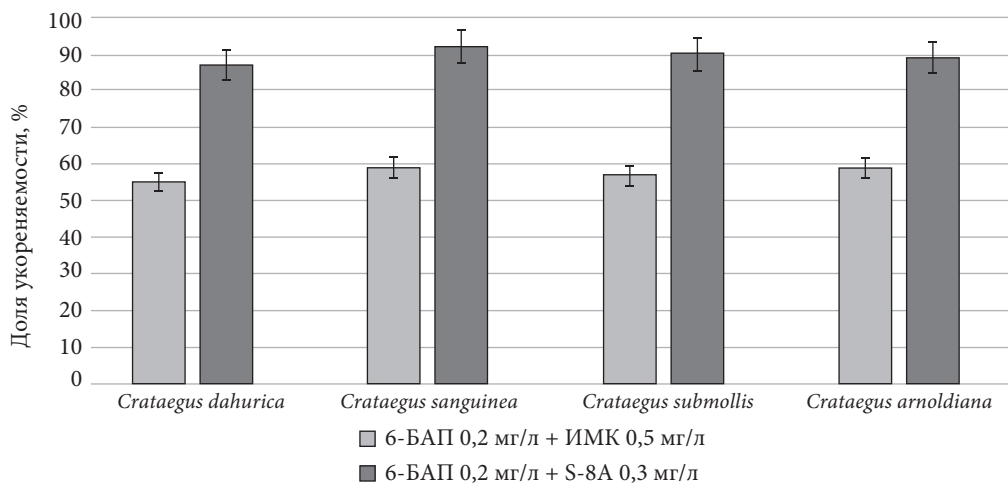


Рис. 2. Влияние стимуляторов роста на укореняемость некоторых представителей рода *Crataegus*

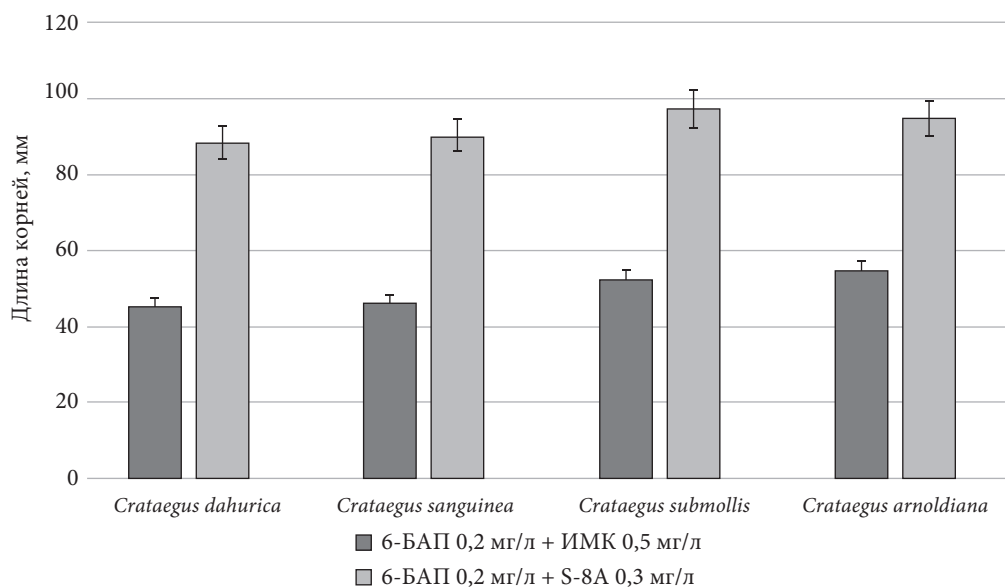


Рис. 3. Влияние стимуляторов роста на длину корней некоторых представителей рода *Crataegus*

Таблица 4. Влияние состава питательной среды на длину (мм) корней регенерантов боярышников

Вариант питательной среды	Fфакт	Fтеор	Сила влияния фактора
Контроль	0,00	2,63	0,00
Вариант 2	58,95	2,63	30,87
Вариант 3	93,51	2,63	42,47

П р и м е ч а н и е. Контроль — среда MS без добавления регуляторов роста; вариант 2 — среда MS с 6-БАП 0,2 мг/л + ИМК 0,5 мг/л; вариант 3 — среда MS с 6-БАП 0,2 мг/л + S-8A 0,3 мг/л.

Заключение

Наши исследования по культивированию исследуемых видов рода *Crataegus* с использованием новой биостимулирующей системы подтвердили большое значение фитогормонов на всех этапах микроклонального размножения. Применяемый биостимулятор может являться не только заменой традиционных ауксинов в питательной среде, но и служить дополнительным источником аминокислот.

В результате проведенного исследования были разработаны приемы микроклонального размножения *C. arnoldiana*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. submollis*, основанные на регенерации растений из апикальных и латеральных почек побега. Обобщая экспериментальные данные, следует отметить тот факт, что гормональный состав питательной среды влияет не только на развитие побега, но и на его морфометрические показатели. При культивировании почек с применением

6-БАП + S-8A удалось достичь увеличения количества побегов и междоузлий, что привело к повышению коэффициента размножения в 1,5–1,6 раза относительно традиционно применяемого стимулятора. Также при использовании 6-БАП + S-8A наблюдалось увеличение длины корней.

Во время проведения исследования наблюдалось образование плотного, имеющего морфогенную структуру каллуса, что может служить хорошим объектом для дальнейшего соматического эмбриогенеза.

На этапе укоренения при использовании ИМК происходило образование укороченных междоузлий, а образовавшаяся корневая система не имела разветвлений. Использование S-8A в сочетании с 6-БАП показало увеличение ризогенеза у культивируемых растений почти в два раза по сравнению с 6-БАП + ИМК.

Таким образом, использование новой биостимулирующей системы S-8A позволило увеличить выход посадочного материала высшей категории качества, полученного методом *in vitro*.

Литература

1. Борисова Е. А. Род боярышник (*Crataegus* L., *Rosaceae*) в городе Иванове // Вестн. Ивановского муницип. ин-та. Сер.: Биология. Химия. Физика. Математика. 2004. Вып. 3. С. 18–24.
2. Блинова К. Ф. и др. Ботанико-фармакогностический словарь: справ. пособие / под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. М.: Высш. шк., 1990. 173 с.
3. Вафин Р. В., Путенихин В. П. Боярышники: интродукция и биологические особенности. М.: Наука, 2003. 224 с.
4. Bujarska-Borkowska B. Breaking of seed dormancy, germination and seedling emergence of the common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) // Dendrobiology. 2002. Vol. 47. P. 61–70.
5. Nas M. N., Gokbunar L., Sevgin N., Aydemir M., Dagli M., Susluoglu Z. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit // Plant Growth Regul. 2012. Vol. 67. P. 57–63.
6. Попкова Л. Л., Теплицкая Л. М. Процессы морфогенеза в длительно культивируемых каллусах боярышника Поярковой (*Crataegus pojarkovae* Kossyach) // Уч. зап. Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер.: Биология, химия. 2009. Т. 22 (61), № 4. С. 135–144.
7. Фирсова М. В., Набиева А. Ю. Особенности введения в культуру *in vitro* боярышника персто-надрезанного (*Crataegus pinnatifida* Burge) // Вестн. Алтайского гос. аграрного ун-та. 2014. № 1 (111). С. 58–62.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
9. Кириллов П. С., Егоров А. А., Трофимук Л. П. Вегетативное размножение *Abies gracilis* в условиях Северо-Запада России с применением новых стимуляторов роста // Леса России: Политика, Промышленность, наука, образование: материалы научно-технич. конф. СПб., 2016. Т. 1. С. 292–295.
10. Кириллов П. С. Микрорепродуктивное размножение *Betula pendula* 'Dalecarlica' с помощью новых стимуляторов роста // Инновационные технологии в лесном хозяйстве ITF-2016: тезисы докладов V Междунар. научно-практич. конф. СПб., 2016. С. 76.
11. Пояркова А. И. Род 733. Боярышник — *Crataegus* L. // Флора СССР: в 30 т. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1939. Т. IX. С. 437–540.
12. Полетико О. М. Род 26. Боярышник — *Crataegus* L. // Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. III: Покрытосеменные. Семейства Трохидендроновые — Розоцветные. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. С. 528.
13. Генетические основы селекции растений / под ред. А. А. Кильчевского, Л. В. Хотыревой. Т. 3. Минск: Беларуская навука, 2012. 490 с.
14. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБк-Пресс, 1999. 160 с.
15. Caboni E., Meneghini M., Tonelli M. Improved micropropagation of Azarole (*Crataegus azarolus* L.) // Propagation of Ornamental Plants. 2010. Vol. 10, N 1. P. 9–13.

16. Dai H., Zhang Z., Guo X. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br.) // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 2007. Vol. 43, N 1. P. 2–8.

17. Iapichino G., Airo M. Multiplication of *Crataegus monogyna* by in vitro culture of nodal segments // III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812. Faro, 2007. P. 135–140.

Для цитирования: Кириллов П. С., Трофимук Л. П. Использование нового регулятора роста для микроразмножения некоторых видов рода *Crataegus* // Вестник СПбГУ. Серия 3. Биология. 2016. Вып. 4. С. 62–75. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.405

References

1. Borisova E. A. Rod boyaryshnik (*Crataegus* L., *Rosaceae*) v gorode Ivanove [The genus (*Crataegus* L., *Rosaceae*) in the city of Ivanovo. *Vestnik of Ivanovo State University. Ser. Biology. Chemistry. Physics. Mathematics*, 2004, vol. 3, pp. 18–24. (In Russian)]

2. Blinova K. F. et al. *Botaniko-farmakognosticheskii slovar': Sprav. posobie* [Botanical-pharmacognosy dictionary: a reference guide]. Eds K. F. Blinova, G. P. Yakovlev. Moscow, Vyssh. Shk. Publ., 1990. 173 p. (In Russian)

3. Vafin R. V., Putenikhin V. P. *Boyaryshniki: introdukciya i biologicheskie osobennosti*. [The hawthorns: introduction and biological features]. Moscow, Nauka Publ., 2003. 224 p. (In Russian)

4. Bujarska-Borkowska B. Breaking of seed dormancy, germination and seedling emergence of the common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.). *Dendrobiology*, 2002, vol. 47, pp. 61–70.

5. Nas M. N., Gokbunar L., Sevgin N., Aydemir M., Dagli M., Susluoglu Z. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit. *Plant Growth Regul.*, 2012, vol. 67, pp. 57–63.

6. Popkova L. L., Teplitskaya L. M. Processy morfogeneza v dlitel'no kul'tiviruemykh kallusakh boyaryshnika Poyarkovoi (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) [The processes of morphogenesis in long-term cultivated the calli poyarkovoi hawthorn (*Crataegus pojarkovae* Cous)]. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo. Ser. Biologiya. Khimiya*, 2009, vol. 22 (61), no. 4, pp. 135–144. (In Russian)

7. Firsova M. V., Nabieva A. Yu. Osobennosti vvedeniya v kul'turu in vitro boyaryshnika perstonadrezannogo (*Crataegus pinnatifida* Burge) [Features of introduction in vitro culture of hawthorn personalizing (*Crataegus pinnatifida* Burge)]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2014, no. 1 (111), pp. 58–62. (In Russian)

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.

9. Kirillov P. S., Egorov A. A., Trofimuk L. P. Vegetativnoe razmnnozhenie *Abies gracilis* v usloviyakh Severo-Zapada Rossii s primeneniem novykh stimulyatorov rosta [Vegetative propagation of *Abies gracilis* in the Northwestern of Russia using new growth promoters]. *Lesn. Rossii: Politika, Promyshlennost, nauka, obrazovanie: materialy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii*. St. Petersburg, 2016, vol. 1, pp. 292–295. (In Russian)

10. Kirillov P. S. Mikroklonal'noe razmnnozhenie *Betula pendula* 'Dalecarlica' s pomoshyu novykh stimulyatorov rosta [Micropropagation of *Betula pendula* 'Dalecarlica' using new growth stimulants]. *Innovatsionnye tekhnologii v lesnom khozyaistve ITF-2016: tezisy dokladov V Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. St. Petersburg, 2016, p. 76. (In Russian)

11. Poyarkova A. I. Rod 733. Boyaryshnik — *Crataegus* L. [The genus 733. Hawthorn — *Crataegus* L.]. *Flora SSSR: v 30 t*. Moscow, Leningrad, USSR Acad. Sci. Publ., 1939, vol. IX, pp. 437–540. (In Russian)

12. Poletiko O. M. Rod 26. Boyaryshnik — *Crataegus* L. [The genus 26. Hawthorn — *Crataegus* L.]. *Derev'ya i kustarniki SSSR. Dikorastushhie, kul'tiviruemye i perspektivnye dlya introdukcii. Vol. III: Pokrytosemennye. Semeystva Trokhodendronovye — Rozotsvetnye* [Trees and shrubs of the USSR. Wild, cultivated and promising for introduction. Vol. III: Angiosperms. Trochodendraceae — Rosaceae]. Moscow, Leningrad, USSR Acad. Sci. Publ., 1954, p. 528. (In Russian)

13. *Geneticheskie osnovy selekcii rastenii*. [Genetic basis of plant breeding]. Eds A. V. Kil'chevskii, L. V. Khotuleva, vol. 3. Minsk, Belarusskaya Nauka Publ., 2012. 489 p. (In Russian)

14. Butenko R. G. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]. Moscow, FBk-Press, 1999. 160 p. (In Russian)

15. Caboni E., Meneghini M., Tonelli M. Improved micropropagation of Azarole (*Crataegus azarolus* L.). *Propagation of Ornamental Plants*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 9–13.

16. Dai H., Zhang Z., Guo X. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, vol. 43, no. 1, pp. 2–8.

17. Iapichino G., Airo M. Multiplication of *Crataegus monogyna* by in vitro culture of nodal segments. *III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812*, Faro, 2007, pp. 135–140.

For citation: Kirillov P.S., Trofimuk L. A. Application of a new growth regulator for micropropagation of some species of the genus *Crataegus*. *Vestnik SPbSU. Series 3. Biology*, 2016, issue 4, pp. 62–75.

DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.405

Статья поступила в редакцию 23 декабря 2015 г.;
принята в печать 12 сентября 2016 г.

Сведения об авторах:

Кириллов Павел Сергеевич — аспирант

Трофимук Лев Павлович — научный сотрудник

Kirillov Pavel S. — Postgraduate

Trofimuk Lev P. — Researcher